

8-MOP + 長波長紫外線照射後のモルモット皮膚における表皮細胞動態の変動

金沢大学医学部皮膚科学教室 (主任：広根孝衛教授)

東 晃

(昭和61年9月1日受付)

フローサイトメリーにより測定されたS期細胞の分画(S分画)および G_2+M 期細胞の分画(G_2+M 分画)の値、プロモデオキシウリジン標識指数および核分裂指数を指標として、長波長紫外線(UV-A)単独1回照射および8-MOP+UV-A(PUVA)1回処置後のモルモット表皮における細胞動態の変動を検索した。UV-A 1, 2, 4 J/cm² 1回照射の場合には、照射部表皮におけるこれらの指標に有意の変動は認められなかった。1 J/cm²照射によるPUVA処置の場合には、S分画の値は6時間後まで対照値と有意に異ならないが、その後増加し72時間後に最大値を示した。 G_2+M 分画は4時間後まで有意の変動を示さないが、その後24時間後まで減少した。次いで増加し、168時間後に最大値を示した。標識指数は6時間後まで減少し、その後増加して72時間後には最大値を示した。核分裂指数は24時間後まで著しく減少し、72時間後対照値のレベルに戻り、その後軽度の増加を示した。なお、UV-Aの照射量が1~4 J/cm²の範囲内では、PUVA処置後のS分画および G_2+M 分画の変動は照射量による差異を示した。すなわち、照射量の増加とともにS分画増加の時期はより遅くなるが増加のピークはより高くなる傾向を示した。また、 G_2+M 分画の値は初期の減少期にもその後の増加期にもより低くなる傾向を示した。得られた成績からPUVA処置後表皮細胞の細胞周期の各期の境界で完全またはほとんど完全なブロックが起こること、その後 G_1-S 境界でのブロック解除によるS期への細胞流入の増加とS期細胞におけるDNA合成の亢進が起こることが推測された。また、S期から G_2 期への流入増加後細胞は一定期間 G_2 期に蓄積されることが示唆された。

Key words flow cytometry, epidermal cell kinetics, PUVA

フロクマリン誘導体の一つである。8-methoxypsoralen (8-MOP)は、初め、日光または人工太陽燈からの紫外線 (ultraviolet light, UVL)照射と組合わせて尋常性白斑の治療に試みられた¹⁾。その後8-MOPの作用波長は320-370 nmであることが明らかにされ²⁾、8-MOP+長波長紫外線(long wavelength ultraviolet light, UV-A)照射、すなわち、PUVA療法として白斑治療に用いられた³⁾。他方ではPUVA処置の生物学的作用が実験的に検討され、PUVA処置は細菌に対して致死作用や突然変異をひきおこすこと⁴⁾、また、DNAウイルスを不活化すること⁵⁾が示され、これ

らの作用はいずれも細胞のDNAの損傷によることが示唆された。腹水癌細胞や培養ヒト線維芽細胞ではPUVA処置により細胞のDNA合成が抑制されること⁷⁾、Hela細胞ではDNA合成だけでなくRNA合成も蛋白合成も抑制されること⁹⁾が報告された。また、8-MOPはUV-A照射下で核のDNAのピリミジン塩基と光結合することによりDNA合成を抑制することが証明された。なお、他のフロクマリン誘導体も8-MOPと同様の機序により同様の生物学的作用を示すことが相次いで報告された¹¹⁾⁻¹⁵⁾。これらの基礎的な知見に基いて、8-MOPまたはtrimethylpsoralen

Abbreviations: BrdUrd, bromodeoxyuridine; FCM, flow cytometry; LI, Labeling index; MI, mitotic index; 8-MOP, 8-methoxypsoralen; PUVA, 8-methoxypsoralen + long wavelength ultraviolet light; TdR, thymidine; TMP, trimethylpsoralen; UV-A, long wavelength ultraviolet light; UV-B, middle wavelength ultraviolet light; UVL, ultraviolet light.

(TMP)を使用した光療法は、表皮の増殖活性の亢進を特徴とする尋常性乾癬の治療に臨床応用されてきた^{16)~18)}。また同時に、PUVAの表皮細胞動態に及ぼす影響が実験的に研究されてきた^{15),19)~21)}。それらの実験的研究は主に³H-thymidine 標識指数 (³H-thymidine labeling index, ³H-TdR LI)をパラメーターとしてPUVA処置後の表皮におけるDNA合成細胞数の変動を検討したものであるが、観察された成績には若干の相違があり、また細胞動態の変動を生じる機構について論じたものは少ない。

そこで著者は、フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM)により測定されたS期およびG₂+M期の細胞分画の値、ブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdUrd) 取込み試験により得られた標識指数 (BrdUrd LI) および組織切片から算定された核分裂指数 (mitotic index, MI) をパラメーターとして、PUVA処置により誘発される表皮細胞動態の変動を検討し、PUVA処置の表皮細胞に対する作用を解明しようと試みた。

材料および方法

1. 実験動物

実験には体重500~800gのHartley系雄白色モルモットを用いた。モルモットは実験の5日前よりケージに1匹ずつ飼育した。PUVA処置の2時間前にモルモットの背部皮膚の毛を電動バリカンで刈り、さらに電気カミソリで丁寧に剃毛した。

2. 照射光源

東芝FL20S-BLB蛍光灯 (波長域300~430nm, ピーク波長352±5nm) 10本を備えた東芝M-DMR-1型デルマレイを光源として使用した。照射時には、中波長紫外線 (middle wavelength ultraviolet light, UV-B) を完全に遮断するため東芝ガラス紫外線透過フィルターUV-35を使用した。このフィルターを使用した時、光源から放射されるUV-Aの強度は光源からの距離20cmのところで3.3mW/cm²であった。照射前に毎回東京光学UVR-305/365 D型紫外線強度計で放射強度を検定した。

3. PUVA処置および生検

モルモットの背部皮膚に20×20mmの方形の窓が右側に3個、左側に4個あるアルミテープを貼布した。照射1時間前、右側の3箇所の窓内皮膚に0.5%8-MOPエタノール液0.06mlを塗布し、左側の3箇所の窓内皮膚に溶媒0.06mlを塗布した。8-MOP液塗布1時間後、左右3対の窓内皮膚にそれぞれUV-A 1, 2, 4 J/cm²を1回照射した。残りの1箇所の窓内皮膚は照射しないで対照とした。照射1, 2, 4, 6, 12,

24, 72, 168, 240時間後にエーテル麻酔下に生検した。細胞周期の日周期変動を除外するために生検は常に午後3時頃に施行した。なお、各条件の動物は1群4匹とした。UV-A 1 J/cm²照射部位、8-MOP+UV-A 1 J/cm²照射 (PUVA 1 J/cm²照射) 部位および非照射部位 (対照) の皮膚片は、いずれもFCM測定、BrdUrd取込み試験およびMI算定用組織標本作製に供した。UV-A及びPUVA 2 J/cm², 4 J/cm²照射部位の皮膚片についてはFCM測定のみ行なった。

4. FCM測定

FCM測定の方法は、川原²²⁾により記載された方法と同じであり、その概要は次のようである。測定用試料を調製するため、皮膚片を0.5%酢酸に4℃で24時間浸漬後、真皮から剥離した表皮片を0.3%ジチオスレイトール液に4℃で15分間浸漬し、引き続き氷冷しつつ超音波処理を施した。超音波処理にはBranson Sonic Power, Model 200 Sonifierを使用した。超音波処理により破碎された細胞の浮遊液をガーゼで濾過し、その濾液を130gで10分間遠心して単離核を採取した。単離核を0.25%ribonuclease液に37℃で30分間浸漬後、沃化プロビジウム50mg/l含有0.18Mトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で1時間染色、20μmナイロンメッシュで濾過し、FCM測定に供した。

単離核のDNA量の測定には日本分光FCM-1 S型フローサイトメーターを使用した。DNAヒストグラムを得るため毎回平均約10万個の核を計測した。G₀+G₁期細胞の分画 (G₀+G₁分画)、S期細胞の分画 (S分画) およびG₂+M期細胞の分画 (G₂+M分画) の値はKosugiら²³⁾のコンピュータープログラムを用いて算定し、いずれも表皮の全有核細胞数に対する百分率で表わした。

5. BrdUrd取込み試験

BrdUrd取込み試験は、Dolbeareら²⁴⁾の方法に準じて行なった。すなわち、皮膚生検の30分前BrdUrd (Sigma) 50mg/kgをモルモットの腹腔内に注射した。生検皮膚片を70%エタノールで24時間固定後54℃でパラフィンに包埋した。4μm切片を脱パラフィン後0.3%過酸化水素 (H₂O₂) 添加メタノールに室温で20分間浸漬、2MHCiに室温で1時間浸漬、0.5%正常ウマ血清 (Vector) に室温で10分間浸漬し、引き続き切片をモノクローナル抗BrdUrd抗体 (Becton Dickinson, 希釈度1:100) に4℃で18時間浸漬した。次いで、ビオチン化ウマ抗マウスIgG抗体 (Vector, 希釈度1:200) に室温で30分間浸漬、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体試薬 (Vector, 希釈度1:100) に室温で45分間浸漬したのち、DAB反応により発色させ、ヘマトキシリンで核

染色した。同一細胞の観察を避けるため3枚目毎の切片を光学顕微鏡で検索した。BrdUrd LIの算定には、毛包間表皮の基底層の細胞核を合計2000個数え、またその間における基底層および基底層直上層の標識細胞数を求め、BrdUrd LIを全標識細胞数の基底細胞数に対する百分率で表わした。

6. MIの算定

皮膚片をBouin液で固定後、通常の如くパラフィンに包埋した。4 μ m切片を脱パラフィン後ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。BrdUrd LIと同様に、3枚目毎の切片を光学顕微鏡で検索した。MIの算定には、基底細胞核を合計2000個数え、また、その間における基底層および基底層直上層に存する分裂前期から分裂終期までの核分裂像を示す細胞数を求め、MIを全分裂細胞数の基底細胞数に対する百分率で表わした。

7. 推計学的処理

S分画、G₂+M分画、BrdUrd LIおよびMIについて、いずれも平均値±標準誤差(mean±SEM)を算定した。対照の値と照射部表皮の値との差はpaired t-testを用いて検定した。

成 績

I. UV-A 1回照射の影響

非照射部表皮(対照)におけるS分画およびG₂+M分画の値は、それぞれ2.21±0.21%、0.85±0.10%であった。UV-A 1回照射部表皮では、1, 2, 4 J/cm²照射のどの場合もS分画の値は、照射12時間後までほとんど変動を示さず、24時間後に軽度の増加を、ま

た、72時間後に軽度の減少を示した(図1)。しかし、実験期間中どの時点においても照射部表皮のS分画の値と対応する照射値との間に有意の差は認められなかった。照射部表皮のG₂+M分画の値は、4 J/cm²照射4時間後軽度に減少した以外にほとんど変動せず、また照射量による著しい差異を示さなかった(図2)。実験期間中どの時点においても照射部表皮のG₂+M分画の値と対応する対照値との間に有意の差は認められなかった。1 J/cm²照射部表皮におけるBrdUrd LIの値は、24時間後の軽度の増加以外に実験期間中ほとんど変動せず、対応する対照値と有意に異ならなかった(図3)。1 J/cm²照射部表皮のMIの値は実験期間中ほとんど変動せず、対応する対照値と有意に異ならなかった(図4)。

II. PUVA 1回処置の影響

1. S分画の値

PUVA 1回処置部表皮のS分画の値は、照射1時間後から6時間後までほとんど変動せず、対照値とほぼ同じであったが、その後顕著な単峰形増加を示した(図5)。すなわち、PUVA 1 J/cm²照射部表皮のS分画の値は12時間後に対応する対照値より有意に増加し(p<0.05)、72時間後に13.09±0.52%のピークに達した。PUVA 2 J/cm²および4 J/cm²照射部表皮のS分画の値は、いずれもやや遅れて24時間後に対する対照値より有意に増加し(それぞれp<0.02, p<0.05)、72時間後にそれぞれ17.70±1.48%, 21.95±2.00%のピークに達した。なお、どの照射量の場合もS分画の値は240時間(10日)後にも依然として対照値より有意に高かった(いずれもp<0.001)。

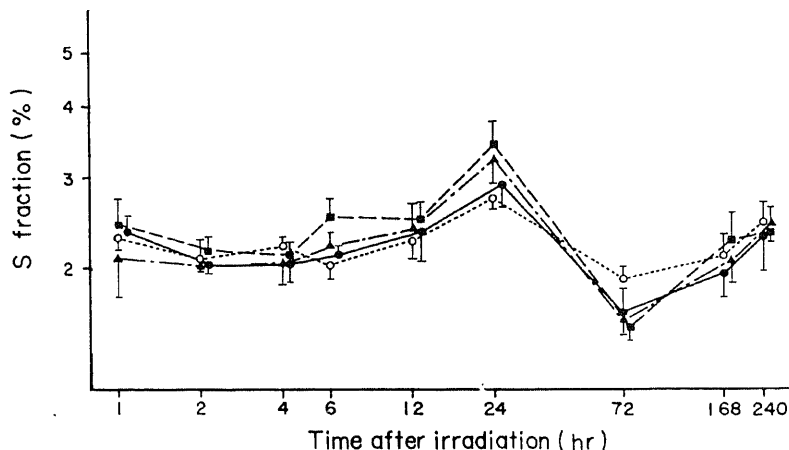


Fig. 1. The S-fractions in guinea pig epidermis after irradiation with UV-A. ○····○, control; ●—●, 1 J/cm²; ▲---▲, 2 J/cm²; ■- -■, 4 J/cm². Each point represents mean ± S.E. (n=4).

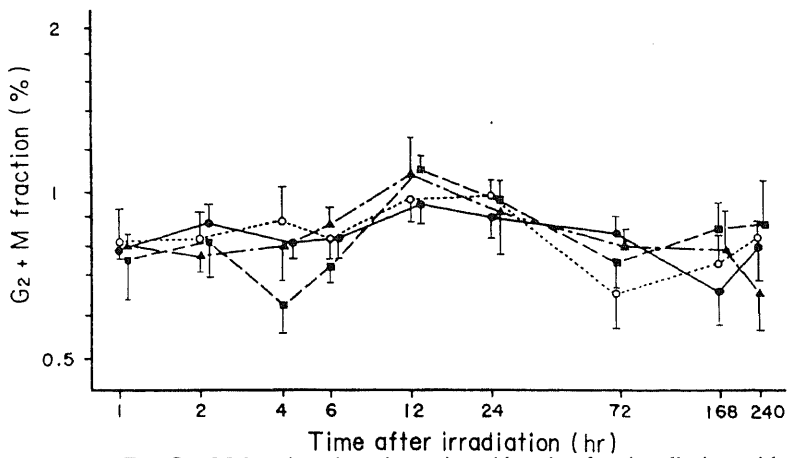


Fig. 2. The G₂+M-fractions in guinea pig epidermis after irradiation with UV-A. ○·····○, control; ●—●, 1 J/cm²; ▲---▲, 2 J/cm²; ■- - -■, 4 J/cm². Each point represents mean ± S.E. (n=4).

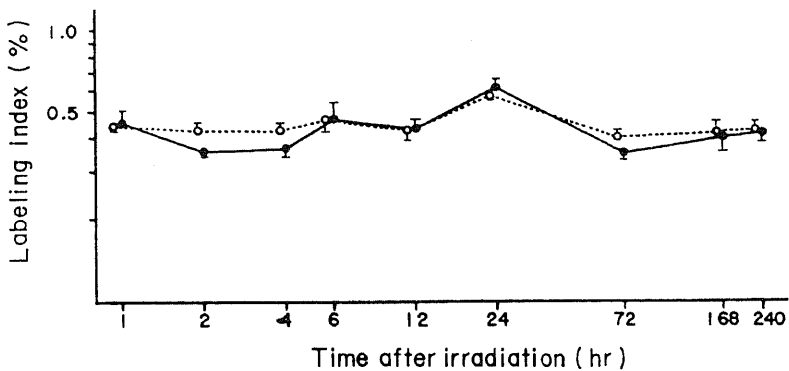


Fig. 3. The labeling indices in guinea pig epidermis after irradiation with UV-A. ○·····○, control; ●—●, 1 J/cm². Each point represents mean ± S.E. (n=4).

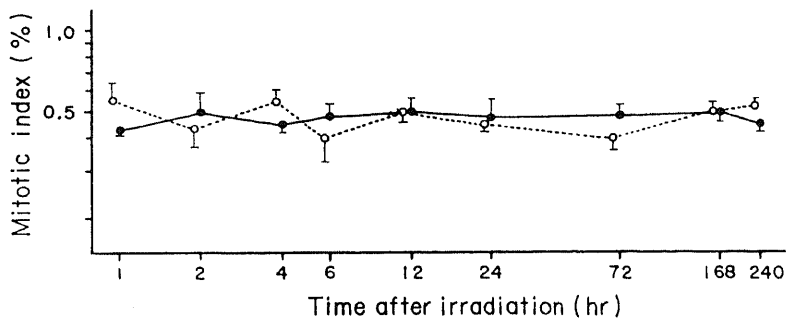


Fig. 4. The mitotic indices in guinea pig epidermis after irradiation with UV-A. ○·····○, control; ●—●, 1 J/cm². Each point represents mean ± S.E. (n=4).

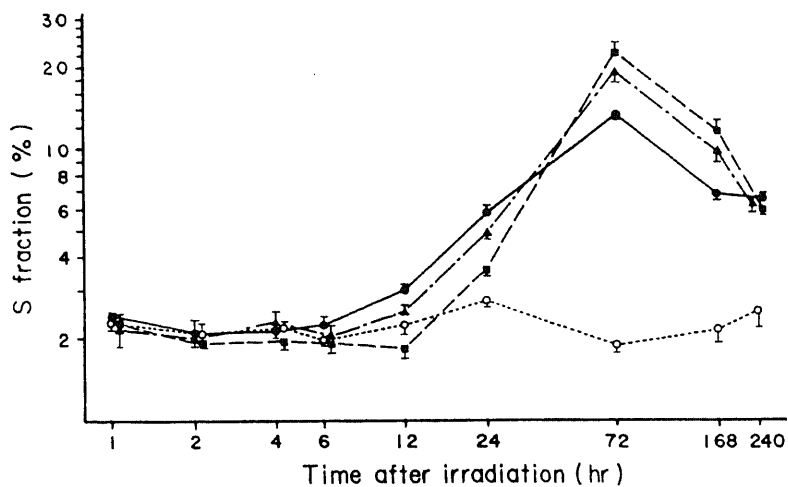


Fig. 5. The S-fractions in guinea pig epidermis after irradiation with PUVA. ○.....○, control; ●—●, 1 J/cm²; ▲—▲, 2 J/cm²; ■—■, 4 J/cm². Each point represents mean \pm S.E. (n=4).

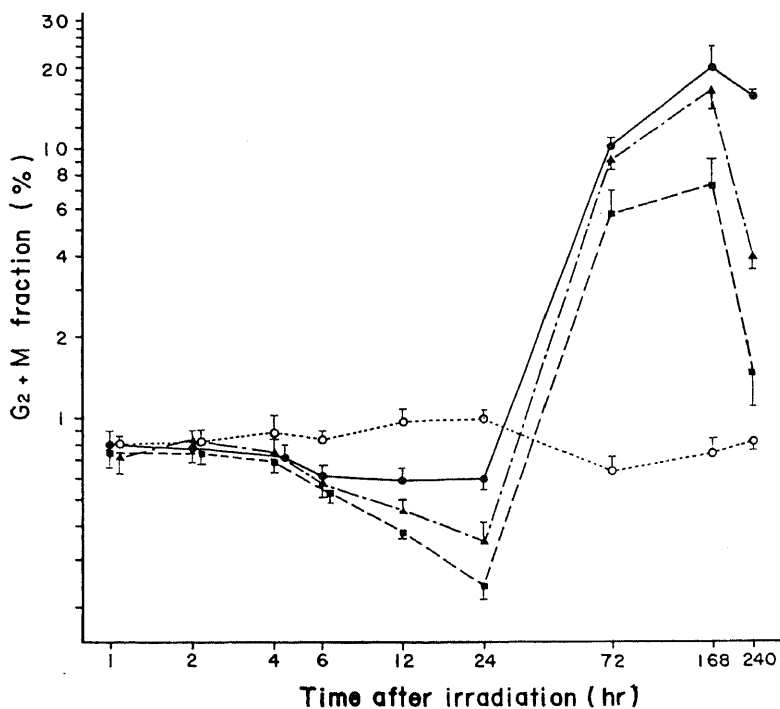


Fig. 6. The G₂+M-fractions in guinea pig epidermis after irradiation with PUVA. ○.....○, control; ●—●, 1 J/cm²; ▲—▲, 2 J/cm²; ■—■, 4 J/cm². Each point represents mean \pm S.E. (n=4).

2. G_2+M 分画の値

PUVA 1 回処置部表皮の G_2+M 分画の値は、1 時間後から 4 時間後までほとんど変動を示さず対照値と有意に異ならなかったが、その後 2 相性の変動を示した (図 6)。すなわち、PUVA 1 J/cm², 2 J/cm² および 4 J/cm² 照射部表皮の G_2+M 分画の値は、いずれも 6 時間後から 24 時間後まで対応する対照値より有意に減少した。また、照射線量が多ければ多いほど G_2+M 分画の値はより顕著に減少し、4 J/cm² 照射部表皮における G_2+M 分画の値は 24 時間後 $0.24 \pm 0.02\%$ に達した。その後、1 J/cm², 2 J/cm² および 4 J/cm² 照射部表皮の G_2+M 分画の値はいずれも急激に増加し、168 時間 (7 日) 後ピークに達した。また、照射線量が多ければ多いほど G_2+M 分画のピークの値はより小さく、168 時間後 1 J/cm² 照射部では $19.82 \pm 4.42\%$ となったが、4 J/cm² 照射部では $7.42 \pm 1.82\%$ であった。なお、1 J/cm² および 2 J/cm² 照射部表皮では G_2+M 分画の値は 240 時間後にも依然として対照値より有意に高かった (それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.02$)。

3. BrdUrd LI

PUVA 1 J/cm² 1 回照射部表皮の LI は 2 相性変動を示した (図 7)。すなわち、LI は照射の 1 時間後から 6 時間後まで対応する対照値より有意に低く ($p < 0.001 \sim 0.05$)、12 時間後には対照値より有意に高くなり ($p < 0.01$)、72 時間後に $24.75 \pm 2.25\%$ の最大値に達した。その後 LI は徐々に低下したが、240 時間後にも依然として対応する対照値より有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。

4. MI

PUVA 1 J/cm² 1 回照射部表皮の MI は、1 時間後から 24 時間後まで対応する対照値より有意に低く ($p < 0.01 \sim 0.05$)、12 時間後 および 24 時間後に $0.05 \pm 0.03\%$ の最小値を示した (図 8)。次いで、72 時間後に対照値のレベルに戻り、168 時間後および 240 時間後には対照値より有意に高い値を示した (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.02$)。

考 察

Walter ら¹⁵⁾は、器官培養したヘアレスマウス表皮に UVA 0.2 J/cm² を 1 回照射後、液体シンチレーションカウンターで DNA 量を測定したが、DNA 量の有意の変動は認められなかったと報告している。さらに Walter ら²⁵⁾は UVA 6.7 J/cm² 1 回照射後のヘアレスマウス表皮の MI を検索したが、これも有意の変動を示さなかったと述べている。Epstein ら¹⁹⁾は、PUVA の光毒性作用に関する実験においてその対照として UVA を単独 1 回照射したヘアレスマウス皮膚における表皮の ³H-TdR LI を検索したが、非照射部表皮の LI との間に有意の差は認められなかったと報告している。一方、Willis ら²⁶⁾は、フィルターで UVB を吸収したキセノンランプからの光線 (UVL+可視光線) をヒト皮膚に照射し、24 時間後に ³H-TdR LI の増加を認めたと述べている。

著者の実験では、FCM 測定による S 分画および G_2+M 分画、BrdUrd LI および MI をパラメーターとして UVA 単独 1 回照射の表皮細胞動態に及ぼす影響

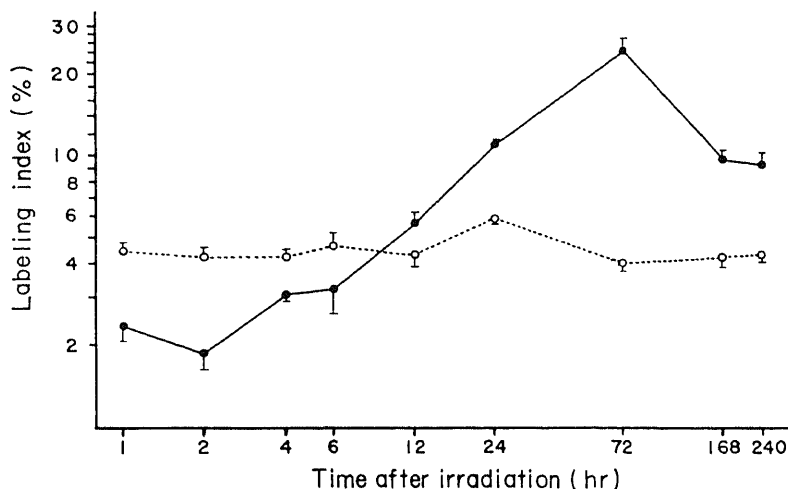


Fig. 7. The labeling indices in guinea pig epidermis after irradiation with PUVA. ○····○, control; ●—●, 1 J/cm². Each point represents mean \pm S.E. (n=4).

を検討したが、照射された線量の範囲内ではこれらのパラメーターに有意の変動は認められなかった。この成績は、パラメーターは異なるけれども Walter ら¹⁸⁾⁽²⁵⁾や Epstein ら¹⁹⁾の成績と同様であった。著者の実験において 24 時間後に S 分画および BrdUrd LI が軽度の増加を示したが、それは照射部でも対照でも認められ、剃毛の影響と考えられた²²⁾。Willis ら²⁶⁾の実験では用いられたフィルターに問題があり、UVB の吸収が不完全であったのではないかとと思われる。

PUVA により誘発される表皮細胞動態の変化を最初に観察したのは Walter ら¹⁹⁾である。彼らは TMP 添加培地で培養したヘアレスマウス表皮に UVA を照射し、4 時間後³H-TdR LI は約 85% 減少することを示した。その後 Epstein ら¹⁹⁾は、UVA 35.2 J/cm² 1 回照射後のヘアレスマウス表皮における³H-TdR LI の変動を検索し、LI は 2 時間後から 6 時間後まで有意に低下したのち、2 日後から 7 日後まで有意に高くなることを報告した。なお、彼らは、6 時間後まで続く DNA 合成細胞数の減少は PUVA 処置により S 期細胞における DNA 合成が直接抑制され、また、G 期から S 期への細胞流入も阻害されるためであろうと推測している。Pullmann ら²⁰⁾は、PUVA 1 回処置後のモルモット表皮における³H-TdR LI の変動を検討し、PUVA 2 J/cm² および 4 J/cm² 照射部表皮の LI はそれぞれ 20 分後および 2 時間後有意に減少すること、また減少期

間は照射量依存的に延長し、4 J/cm² 照射部では 4 時間後までであるが、6 J/cm² 照射部では 72 時間後まで継続することを観察した。また、同時に行なった UVB 単独照射部における表皮の LI の変動と比較し、PUVA 処置部における表皮の LI 低下はより早期に起り、より長く続くことを指摘している。すなわち、PUVA 処置後まもなく G₁-S 境界でのブロックが起るので S 期への細胞流入は減少する。その後 G₁-S 境界ブロックが解除され、S 期への細胞流入は増加するが、S 期細胞の増加は流入の増加によるだけでなく、S 期からの流出の減少にもよるであろうと推測している。最近 Gange²¹⁾は、PUVA 1 回処置後のヘアレスマウス表皮における³H-TdR の取込みをシンチレーションカウンターで測定し、PUVA 0.9 J/cm² 照射後 4 時間目から 24 時間目まで³H-TdR 取込み量は減少し、その後 48 時間目から 96 時間目までは対照レベルに戻ることを、また、UVA の照射線量が 1.8 J/cm², 3.6 J/cm² の場合には³H-TdR 取込み量は 4 日目から 10 日目まで対照レベルより増加することを報告している。以上述べたように、従来、PUVA 処置の表皮細胞動態に及ぼす作用に関する実験的研究は、いずれも³H-TdR 取込み試験によるものであり、それらの実験成績は、PUVA 処置が表皮細胞の DNA 合成に関して 2 相性反応を誘発するという点でほぼ一致している。

著者の実験では、PUVA 1 J/cm² 1 回照射部表皮に

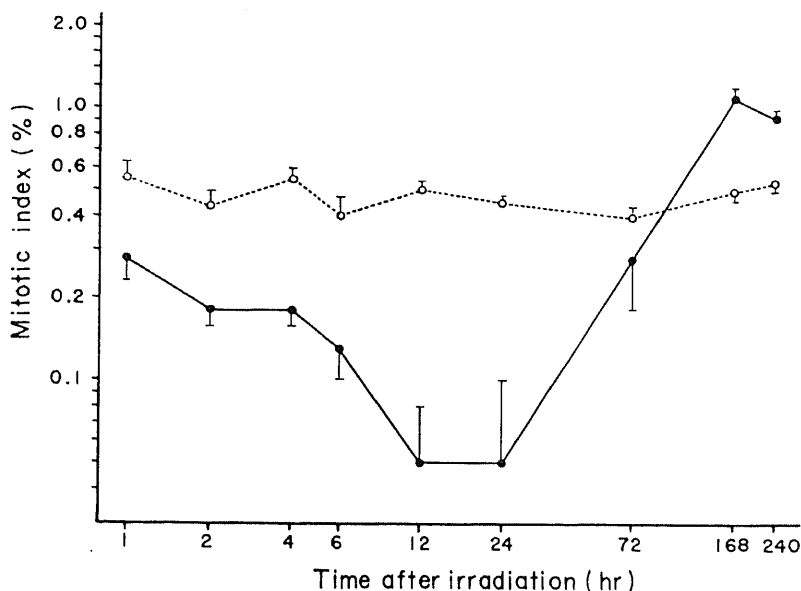


Fig. 8. The mitotic indices in guinea pig epidermis after irradiation with PUVA. ○.....○, control; ●——●, 1 J/cm². Each point represents mean ± S.E. (n=4).

において BrdUrd LI は 2 相性変動を示し、照射 6 時間後まで有意に低下したのち、12 時間後から著明に上昇することが観察された。また、MI も 2 相性変動を示したが、MI の低下期間は LI のそれよりも長く、24 時間後まで続いた。注目すべきことは、PUVA 処置後から 6 時間後まで LI は低下したが FCM 測定による S 分画の値は変動を示さなかったことである。このことは、6 時間後まで個々の細胞における DNA の合成の低下ないし停止により DNA を合成している細胞の数が減少していること、しかし、この期間中 S 期の細胞流入と流出の均衡が保たれていることを意味する。この一見相反する現象は、この期間中 G_1 -S 境界および S- G_2 境界において完全なまたはほとんど完全なブロックが起るとすれば矛盾なく説明できる。LI の低下が FCM 測定による S 分画の値にほとんど反映しないという現象は、川原²²⁾により UVB 1 回照射後のモルモット表皮でも観察されている。また、6 時間後まで MI は低下したが FCM 測定による G_2 +M 分画の値は不変であったことは、この期間中 S- G_2 境界および G_2 -M 境界において不完全なブロックが起ることを示唆している。このように、PUVA 1 J/cm²照射部表皮では照射直後に細胞周期の各期の境界で完全または不完全なブロックが起り、それは 6 時間後まで継続することが推測された。

PUVA 1 J/cm²照射後の LI および S 分画の変動曲線は、6 時間過ぎて G_1 -S 境界ブロックが解除されたのち、 G_1 期の後期で同調した細胞が S 期に流入するとともに S 期細胞において DNA 合成の亢進が起ることを示している。また、 G_2 +M 分画の減少が 24 時間後まで続くことから、S 期細胞の増加は S 期への流入増加によるだけでなく、S 期からの流出の減少にもよると考えられた。この点に関しては、著者の成績は上述の Pullmann ら²⁰⁾の推測に対して、より明確な根拠を与えたものといえる。なお、 G_2 +M 分画の値は 72 時間と 168 時間後に対照値の 20 倍以上に達したにもかかわらず、MI の値は 72 時間と 168 時間後にそれぞれ対照値のレベルとその後約 2 倍にすぎなかったことは、この期間中細胞が G_2 期に蓄積することを示唆している。以上述べたような PUVA 処置後における表皮細胞動態の変動は、川原²²⁾によって観察された UVB 1 回照射後における表皮細胞動態の変動とほぼ同様であるが、紫外線照射後に起る細胞周期の各期の境界でのブロックの持続時間は UVB 照射の場合よりも PUVA 処置の場合により長く、また M 期への進行阻害の持続時間も PUVA 処置の場合により長いように思われる。なお、この実験では PUVA 処置後の表皮細胞動態の変化が UVA の照射量によりやや異なること

が明らかにされた。すなわち、用いられた照射量の範囲内では、照射量の増加とともに S 分画の値はより長く対照レベルにとどまるが、しかし、その後の増加のピークはより高くなること、また G_2 +M 分画の値は初期の減少期にもその後の増加期にもより低くなることが示された。

さて、PUVA 処置は表皮細胞の増殖活性の亢進を特徴とする尋常性乾癬に有効な治療法として用いられ、通常週 1～2 回の割合で連続施行されている。上述のように PUVA 1 回処置で表皮細胞の増殖活性はせいぜい 24 時間しか抑制されないの、この抑制効果だけで PUVA の乾癬に対する臨床効果を説明することは困難である。その説明のために考えられる手懸りの一つは PUVA 処置後 G_2 期に蓄積された細胞の行方である。この実験では、増加した G_2 期細胞がすべて M 期に移行することを示す成績は得られなかったので、 G_2 期細胞の多くが細胞周期から外れる可能性が考えられる。もう一つの考えられる手懸りは、PUVA 処置後の表皮における細胞の turnover の速さの変化である。この実験では、表皮細胞の turnover の問題を扱わなかったが、PUVA 処置後表皮細胞は、増殖活性の抑制期を経て亢進期に入るとともに、その turnover も亢進する可能性が考えられる。これらはいずれも今後検討すべき問題である。

結 論

UVA 単独照射及び PUVA 処置後のモルモット皮膚における表皮細胞動態の変動を S 分画及び G_2 +M 分画 (FCM 測定)、標識指数及び分裂指数を指標として検討した。得られた成績は次のようである。

1. UVA 単独照射の場合、1～4 J/cm²の範囲内では対照と比較して有意の変動は認められなかった。

2. PUVA 1 J/cm²照射部では、表皮の S 分画の値は 6 時間後まで変らず、12 時間後から増加して 72 時間後ピークに達した。 G_2 +M 分画の値は 4 時間後まで変らず、その後 24 時間後まで減少したのち増加し、168 時間後ピークに達した。

3. PUVA 1 J/cm²照射部では、表皮の標識指数は 6 時間後まで減少し、その後増加した。分裂指数は 24 時間後まで減少し、その後軽度増加した。

4. PUVA 1～4 J/cm²の範囲内では、照射量の増加とともに S 分画増加の時期はより遅く増加のピークはより高くなること、また G_2 +M 分画は初期の減少期にもその後の増加期にもより低い値を示した。

以上、PUVA 処置後表皮細胞の細胞周期の各期の境界で完全または不完全なブロックが起ること、その後 G_1 -S 境界でのブロック解除による S 期への細胞流入

の増加とS期細胞におけるDNA合成の亢進が起ること、またS期からG₂期への流入増加後細胞は一定期間G₂期に蓄積されることが推測された。

謝 辞

稿を終るに当たり、御指導および御校閲いただきました広根孝衛教授に深甚の謝意を表します。本研究の要旨は第85回日本皮膚科学会学術大会(昭和61年、京都)において発表した。

文 献

- 1) Lerner, A. B., Denton, C. R. & Fitzpatrick, T. B.: Clinical and experimental studies with 8-methoxypsoralen in vitiligo. *J. Invest. Dermatol.*, **20**, 299-314 (1953).
- 2) Buck, H. W., Magnus, I. A. & Porter, A. D.: The action spectrum of 8-methoxypsoralen for erythema in human skin. *Br. J. Dermatol.*, **72**, 249-255 (1960).
- 3) James, E. F. Jr., James, L. & Christopher, P.: Treatment of vitiligo with topical methoxsalen and blacklight. *Arch. Dermatol.*, **100**, 224-229 (1969).
- 4) Oginsky, E. L., Green, G. S., Griffith, D. G. & Fowlks, W. L.: Lethal photosensitization of bacteria with 8-methoxypsoralen to long wave length ultraviolet radiation. *J. Bacteriol.*, **78**, 821-833 (1959).
- 5) Mathews, M. M.: Comparative study of lethal photosensitization of *Sarcina lutea* by 8-methoxypsoralen and toluidine blue. *J. Bacteriol.*, **83**, 322-328 (1963).
- 6) Musajo, L., Rodighiero, G., Colombo, G., Torlone, V. & Dall'acqua, F.: Photosensitizing furocoumarins; Interaction with DNA and photo-inactivation of DNA containing viruses. *Experientia*, **21**, 22-24 (1965).
- 7) Bordin, F., Baccichetti, F. & Musajo, L.: Inhibition of nucleic acids synthesis in Ehrlich ascite tumor cells by irradiation in vitro in the presence of skin-photosensitizing furocoumarins. *Experientia*, **28**, 148 (1972).
- 8) Baden, H. P., Parrington, J. M., Delhahty, D. A. & Pathak, M. A.: DNA synthesis in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts following treatment with 8-methoxypsoralen and long wave ultraviolet light. *Biochim. Biophys. Acta.*, **262**, 247-255 (1972).
- 9) Bordin, F., Baccichetti, F., Bevilacqua, R & Musajo, L.: Inhibition of protein synthesis in Ehrlich ascite tumor cells by irradiation (365nm) in the presence of skin-photosensitizing furocoumarins. *Experientia*, **29**, 272-273 (1973).
- 10) Mizuno, N., Tuneishi, S., Matsuhashi, S., Kimura, S., Fujimura, Y. & Ushijima, T.: Some aspects on the action mechanism of 8-methoxypsoralen photosensitization, p389-409. In Pathak, M. A. et al. (ed), *Sunlight and Man*, Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 1974.
- 11) Musajo, L. & Rodighiero, G.: Studies on the photo-C₄-cyclo-addition reactions between skin-photosensitizing furocoumarins and nucleic acids. *Photochem. photobiol.*, **11**, 27-35 (1970).
- 12) Cole, S. R.: Light induced cross-linking of a furocoumarin (psoralen). *Biochim. Biophys. Acta.*, **217**, 30-40 (1970).
- 13) Dallacqua, F., Marciani, S. & Rodighiero, G.: Inter-strand crosslinkages occurring in the photoreaction between psoralen and DNA. *FEBS Lett.*, **9**, 121-123 (1970).
- 14) Trosko, J. E. & Isoun, M.: Photosensitizing effect of trisoralen on DNA synthesis in human cells grown in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.*, **19**, 87-92 (1971).
- 15) Walter, J. F., Voorhees, J. J., Kelsey, W. H., Duell, E. A. & Mich, A. A.: Psoralen plus black light inhibits epidermal DNA synthesis. *Arch. Dermatol.*, **107**, 861-865 (1973).
- 16) Walter, J. F. & Voorhees, J. J.: Psoriasis improved by psoralen plus black light. *Acta. Derm. -Venereol.*, **53**, 469-472 (1973).
- 17) Parrish, J. A., Fitzpatrick, T. B., Tanenbaum, L. & Pathak, M. A.: Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxalen and long wave ultraviolet light. *New England J. Med.*, **291**, 1207-1222 (1974).
- 18) 水野信行・大野盛秀・植松茂生: 尋常性乾癬の8-methoxypsoralen光療法. *日皮会誌*, **85**, 577-586 (1975).
- 19) Epstein, J. H. & Fukuyama, K.: Effect of 8-methoxypsoralen-induced phototoxic effects on mammalian epidermal macromolecule synthesis in vitro. *Photochem. photobiol.*, **21**, 325-330 (1975).
- 20) Pullman, H., Galosi, A., Jakobeit, C. & Steigleder, G. K.: Effects of selective ultraviolet

phototherapy (SUP) and local PUVA treatment on DNA synthesis in guinea pig skin. *Arch. Dermatol. Res.*, **267**, 37-45 (1980).

21) Gange, R. W.: Epidermal ornithine decarboxylase activity and thymidine incorporation following treatment with ultraviolet A combined with topical 8-methoxypsoralen or anthracene in the hairless mouse. *Br. J. Dermatol.*, **105**, 247-255 (1981).

22) 川原 繁: 中波長紫外線 1 回照射後のホルモント皮膚における表皮細胞動態の変動. *日皮会誌*, **96**, (1986).

23) Kosugi, Y., Ikebe, J., Sekine, M., Musha, T., Shitara, N., Kohno, T. & Takakura, K.: Computer aided analysis of cell cycle phase from

cytophotometric histogram. *Ieee. Trans. Biomed Eng.*, **BME-25**, 429-434 (1978).

24) Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M. G. & Gray, J. W.: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5573-5577 (1983).

25) Walter, J. F., Stoughton, R. B. & Dequoy, P. R.: Suppression of epidermal proliferation by ultraviolet light, coal tar and anthralin. *Br. J. Dermatol.*, **99**, 89-96 (1978).

26) Willis, I., Kligman, A. & Epstein, J.: Effects of long ultraviolet rays on human skin: photoprotective or photoaugmentative?. *J. Invest. Dermatol.*, **59**, 416-420 (1973).

Variations in Epidermal Cell Kinetics of Guinea Pig Skin after Single Treatment with 8-MOP+UV-A Akira Higashi, Department of Dermatology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **95**, 748—757 (1986)

Key words: flow cytometry, epidermal cell kinetics, PUVA

Abstract

The present study investigated the effects of single radiation with long wavelength ultraviolet light (UV-A) and single treatment of 8-methoxypsoralen (8-MOP)+UV-A (PUVA) on epidermal cell kinetics of guinea pig skin. After shaving, the dorsal skin of the animals was exposed to 1, 2 and 4 J/m² of UV-A with or without 8-MOP. Flow cytometry was used to study the variations in the fractions of cells with 2-4c DNA-content (S-fraction) and 4c DNA-content (G₂+M-fraction). Bromodeoxyuridine incorporation was used to examine the variability in labeling index. Conventional histological techniques were used to examine the variability in mitotic index. No significant changes were seen in these epidermal cell kinetic parameters after single exposure to UV-A. After PUVA treatment with a dose of 1 J/cm², the S-fraction showed the level of the controls during the first 6 hrs, followed by a maximum increase at 72 hrs. The G₂+M-fraction showed an initial decrease of 24 hrs duration, followed by a marked maximum increase at 168 hrs. The labeling index was below the control level until 6 hrs, and thereafter increased to a maximum at 72 hrs. The mitotic index was markedly depressed during the first 24 hrs. The values for mitotic index did not differ significantly from those of the controls at 72 hrs, and thereafter slightly exceeded the control level. With increasing doses of UV-A the values of the G₂+M-fraction became smaller in both the initial decreasing and subsequent increasing phases. The results suggest that immediately after treatment, PUVA induces a complete or nearly complete blockage at all of the boundaries of the four phases of the cell cycle. It is also suggested that PUVA gives rise to an accumulation of cells in the G₂-phase due to prolonged blockage at the G₂-M boundary and increased influx of cells from the S-phase to the G₂-phase after the G₁-S and S-G₂ blocks are released.